

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)



REC'D 04 APR 2003

WIPO

PCT

Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

Aktenzeichen:

102 10 239.2

Anmeldetag:

08. März 2002

Anmelder/Inhaber:

CellControl Biomedical Laboratories AG,
Planegg/DE

Bezeichnung:

Spezifische Ab 1'-Antikörper gegen das Tumor-
assoziierte Antigen CA 125

IPC:

C 07 K, A 61 K, C 12 N

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ur-
sprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 18. März 2003
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

Wallace

BEST AVAILABLE COPY

WEICKMANN & WEICKMANN

Patentanwälte
European Patent Attorneys · European Trademark Attorneys

Unser Zeichen:
27680P DE/HBDRwr

Anmelder:
CellControl Biomedical
Laboratories AG
Am Klopferspitz 19
82152 Martinsried

DIPL.-ING. H. WEICKMANN (bis 31.1.01)
DIPL.-ING. F. A. WEICKMANN
DIPL.-CHEM. B. HUBER
DR.-ING. H. LISKA
DIPL.-PHYS. DR. J. PRECHTEL
DIPL.-CHEM. DR. B. BOHM
DIPL.-CHEM. DR. W. WEISS
DIPL.-PHYS. DR. J. TIESMEYER
DIPL.-PHYS. DR. M. HERZOG
DIPL.-PHYS. B. RUTTENSBERGER
DIPL.-PHYS. DR.-ING. V. JORDAN
DIPL.-CHEM. DR. M. DEY
DIPL.-FORSTW. DR. J. LACHNIT

Spezifische Ab1'-Antikörper gegen das Tumor-assoziierte Antigen CA125

Spezifische Ab1'-Antikörper gegen das Tumor-assoziierte Antigen CA125

Beschreibung

5 Die vorliegende Erfindung betrifft spezifische anti-anti-idiotypische Antikörper welche mit anti-idiotypischen anti-CA125-Antikörpern reagieren und für das Tumor-assoziierte Antigen CA125 spezifisch sind. Insbesondere betrifft die vorliegende Erfindung einen CA125-spezifischen
10 anti-anti-idiotypischen Antikörper, der mit dem anti-idiotypischen anti-CA125-Antikörper ACA125 reagiert. Des Weiteren betrifft die vorliegende Erfindung diese anti-anti-idiotypischen Antikörper enthaltende pharmazeutische Zusammensetzungen zur Behandlung von CA125-exprimierenden Tumoren, insbesondere von Ovarialkarzinomen.

15 Immuntherapien zur Behandlung von Tumorerkrankungen sind seit einigen Jahren Gegenstand zahlreicher Forschungsstudien. Obwohl Tumor-assoziierte Antigene für verschiedenste Tumorarten bekannt sind, konnte jedoch eine Tumorabstoßung mittels Vakzinierung nur in seltenen Fällen
20 beobachtet werden. So wurde beispielsweise versucht, Ovarialkarzinome durch Vakzinierung mit dem Tumor-assoziierten Antigen CA125 zu behandeln. Eine Tumorabstoßung durch das Immunsystem schlug jedoch fehl. Vielmehr wurde vermutet, dass die nahe Verwandtschaft zwischen dem Tumor-assoziierten Antigen CA125 und Autoantigenen für die
25 fehlende Anti-Tumor-Immunität verantwortlich ist.

Ein erfolgversprechender Ansatz, um die immunologische Toleranz gegen das Tumor-assoziierte Antigen CA125 zu überwinden, basiert auf der
30 idiotypischen Netzwerk-Hypothese unter Verwendung von anti-idiotypischen Antikörpern gegen den anti-CA125-Antikörper. Das diesem Ansatz zugrundeliegende Ziel ist, anti-idiotypische anti-CA125-Antikörper bereitzustellen, die so perfekt in die Antigen-Bindungsregion des anti-

CA125-Antikörpers passen, dass die Antigen-Bindungsregionen der anti-idiotypischen anti-CA125-Antikörper eine Kopie der CA125-Antigen-Determinante darstellen und somit das Antigen CA125 funktionell immitieren. Der anti-idiotypische anti-CA125-Antikörper ACA125, der
5 durch das Hybridom 3D5 (DSM ACC 2120) erzeugt wird, immitiert das Tumor-assoziierte Antigen CA125 und wird zur Immunisierung gegen CA125-exprimierende Tumoren eingesetzt (EP 0 700 305 B1 und US 5,858,361).

10 Aufgabe der vorliegenden Erfindung war es nun, anti-anti-idiotypische Antikörper gegen anti-idiotypische anti-CA125-Antikörper und insbesondere gegen den anti-idiotypischen anti-CA125-Antikörper ACA125 bereitzustellen, welche mit dem Tumor-assoziierten Antigen CA125 reagieren und so eine Antikörper-abhängige zelluläre Cytotoxizität (ADCC)
15 gegen CA125-exprimierende Tumorzellen vermitteln.

Diese Aufgabe wurde erfindungsgemäß dadurch gelöst, dass im Rahmen der vorliegenden Erfindung anti-anti-idiotypische anti-CA125-Antikörper aufgefunden wurden, welche eine ADCC gegen CA125-exprimierende
20 Tumorzellen auslösen können.

Ein Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist daher ein anti-anti-idiotypischer Antikörper, der

- 25
- (i) mit einem anti-idiotypischen Antikörper gegen den anti-CA125-Antikörper reagiert,
 - (ii) spezifisch für das Tumor-assoziierte Antigen CA125 ist und mit diesem reagiert, und
 - (iii) eine Antikörper-abhängige zelluläre Cytotoxizität gegen CA125-exprimierende Tumorzellen vermittelt.

30 In einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung ist der anti-anti-idiotypische Antikörper ein Antikörper, der mit dem durch das

Hybridom 3D5 (DSM ACC 2120) produzierten monoklonalen anti-idiotypischen anti-CA125-Antikörper ACA125 reagiert.

5 Der erfindungsgemäße anti-anti-idiotypische Antikörper kann als polyklonaler oder monoklonaler Antikörper vorliegen.

10 Der erfindungsgemäße polyklonale anti-anti-idiotypische Antikörper kann nach jedem herkömmlichen, dem Fachmann bekannten Verfahren zur Herstellung von polyklonalen Antikörpern erzeugt werden. Vorzugsweise wird der polyklonale anti-anti-idiotypische Antikörper durch Vakzinierung mit einem anti-idiotypischen Antikörper gegen den anti-CA125-Antikörper als Folge einer polyklonalen Immunantwort erzeugt. Besonders bevorzugt wird der polyklonale anti-anti-idiotypische Antikörper durch Vakzinierung gegen den monoklonalen anti-idiotypischen anti-CA125-Antikörper
15 ACA125 erzeugt.

20 Der erfindungsgemäße monoklonale anti-anti-idiotypische Antikörper kann nach herkömmlichen, dem Fachmann bekannten Verfahren zur Herstellung von monoklonalen Antikörpern, wie beispielsweise durch Verwendung von Hybridomzellen, erzeugt werden. Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist daher eine Hybridomzelllinie, die den erfindungsgemäßen monoklonalen anti-anti-idiotypischen Antikörper produziert.

25 In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung kann der anti-anti-idiotypische Antikörper rekombinant erzeugt werden.

30 Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung betrifft ein Fragment eines erfindungsgemäßen anti-anti-idiotypischen Antikörpers, das die Bindungskapazität des anti-anti-idiotypischen Antikörpers besitzt. Vorzugsweise umfasst das erfindungsgemäße Fragment wenigstens ein Fab- oder F(ab)₂-Fragment. Das Fragment kann vorzugsweise mit einem anti-idiotypischen Antikörper gegen den anti-CA125-Antikörper reagieren,

ist spezifisch für das Tumor-assoziierte Antigen CA125 und kann eine Antikörper-abhängige zelluläre Cytotoxizität gegen CA125-exprimierende Tumorzellen vermitteln. Des Weiteren kann das erfindungsgemäße Fragment durch herkömmliche, dem Fachmann bekannte Verfahren, wie
5 Proteolyse, limitierte Proteolyse, rekombinante Expression, etc., hergestellt werden.

Noch ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist eine pharmazeutische Zusammensetzung, umfassend einen erfindungsgemäßen
10 anti-anti-idiotypischen Antikörper oder ein erfindungsgemäßes Fragment davon. Die erfindungsgemäße pharmazeutische Zusammensetzung kann zusätzlich gegebenenfalls pharmazeutisch übliche Träger- und Hilfsstoffe enthalten.

15 Die erfindungsgemäße pharmazeutische Zusammensetzung kann in einer topisch, parenteral, intravenös, intramuskulär, subkutan oder transdermal verabreichbaren Form vorliegen und kann mit Hilfe herkömmlicher, dem Fachmann bekannter Verfahren hergestellt werden. Vorzugsweise wird die erfindungsgemäße pharmazeutische Zusammensetzung in Form von
20 Tabletten oder als intravenöse Injektion bzw. Infusion hergestellt.

Die erfindungsgemäße pharmazeutische Zusammensetzung wird zur Behandlung und/oder Prophylaxe von CA125-exprimierenden Tumoren eingesetzt. Vorzugsweise wird die erfindungsgemäße pharmazeutische
25 Zusammensetzung zur Behandlung und/oder Prophylaxe von Ovarialkarzinomen eingesetzt.

Dabei wird die erfindungsgemäße pharmazeutische Zusammensetzung einem Patienten mit einer Tumorerkrankung in einer Menge verabreicht, die
30 ausreichend ist, um eine Behandlung des entsprechenden CA125-exprimierenden Tumors zu erzielen. Die zu verabreichende Menge der pharmazeutischen Zusammensetzung hängt dabei von mehreren Faktoren

ab, wie z.B. die Art der Verabreichung (Tablette, Injektion, Infusion, etc.), der Art und dem Ausmaß der Tumorerkrankung und dem Alter, Gewicht und Allgemeinzustand des Patienten und kann ohne weiteres von einem Fachmann auf dem Gebiet der Tumorerkrankung unter Berücksichtigung der
5 oben genannten Faktoren bestimmt werden.

Die Verabreichung der erfindungsgemäßen pharmazeutischen Zusammensetzung erfolgt topisch, parenteral, intravenös, intramuskulär, subkutan oder transdermal. Vorzugsweise wird die pharmazeutische
10 Zusammensetzung in Form von Tabletten oder als intravenöse Injektion bzw. Infusion verabreicht. In einzelnen Fällen kann auch eine gezielte Einspritzung der pharmazeutischen Zusammensetzung in Körperhöhlen oder über einen Katheter in die Blutgefäße der Tumorregion bzw. des Organs, in dem der Tumor sitzt, erfolgen.

15 Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung betrifft die Verwendung eines erfindungsgemäßen anti-anti-idiotypischen Antikörpers zur Behandlung und/oder Prophylaxe von CA125-exprimierenden Tumoren, insbesondere Ovarialkarzinom.

20 Die nachfolgenden Figuren sowie das nachfolgende Beispiel sollen die Erfindung näher veranschaulichen.

Figuren

25

Figur 1 zeigt eine Übersicht des Ab3-Responder Kollektivs: Induktion des CA125-spezifischen Ab3-Antikörpers Ab1' und ADCC-Antwort.

30 Figur 2 zeigt den Nachweis einer ADCC-Antwort gegen CA125-positive Zellen (OAW-42) versus CA125-negative Zellen (SKOV-3) in 14 von 26 Patientinnen.

Figur 3 zeigt den Nachweis des CA125-spezifischen Ab3-Antikörpers Ab1' in ADCC-positiven (A und C) und ADCC-negativen (B und D) Patientinnen. A und B: Bindung von Prä- und Postimmunserum (1:20) an CA125-positive (OAW-42) versus CA125-negative Zellen (SKOV-3). C und D: Nachweis von freien Ab1' und Ab1'-Immunkomplexen im Postimmunserum (1:50) mit isoliertem CA125-Antigen (ELISA). Präimmunseren zeigten keine Reaktivität mit dem CA125-Antigen.

Beispiel

10

Einleitung

Im Rahmen einer klinischen Phase I/II Studie wurden Ovarialkarzinom-Patientinnen mit dem anti-idiotypischen anti-CA125-Antikörper ACA125 (Ab2) immunisiert, welcher das Tumor-assoziierte Antigen CA125 funktionell imitiert. Die Induktion spezifischer anti-anti-idiotypischer Antikörper Ab3 gegen ACA125 (Ab2) als Surogat-Marker für eine Immunreaktion hat einen positiven Einfluss auf das Überleben der Patientinnen. Das Ziel der vorliegenden Studie bestand darin, die Ab3-Antwort näher zu charakterisieren und zu zeigen, inwiefern anti-anti-idiotypische Antikörper Ab3 eine Antikörper-abhängige zelluläre Cytotoxizität (ADCC) gegen CA125-exprimierende Tumorzellen vermitteln können.

Durchführung

In einem Kollektiv von 26 Ab3-positiven Patientinnen ($\text{Ab3} > 10.000 \text{ arbU/ml}$) wurde die Induktion von CA125-spezifischen Ab3-Antikörpern (Ab1') mit Hilfe unterschiedlicher Assayformate evaluiert. Zum Nachweis der Bindung an membranständiges CA125-Antigen wurden CA125-positive (OAW-42) und CA125-negative (SKOCV-3) Ovarialkarzinomzellen (SKOV-3) mit Prä- und Postimmunseren der Patientinnen (1:20) inkubiert und nach Färbung mit FITC-konjugierten anti-human IgG durchflusszytometrisch analysiert.

Zusätzlich wurde die Reaktivität von Ab1' sowie von Ab1', die an zirkulierendes CA125 gebunden sind (Komplexe), im Serum (1:50) mit isoliertem CA125-Antigen untersucht (ELISA). Dazu wurden CA125-beschichtete Mikrotiterplatten mit Prä- und Postimmunserum inkubiert und gebundene Ab1' durch Zweischnitt-Detektion mit ACA125 (Ab2) und HRP-markiertem anti-Maus IgG (Fc-spezifisch) nachgewiesen. Die Detektion der Ab1'-Immunkomplexe erfolgte analog nach Dissoziation der Komplexe durch Säure- und Hitzebehandlung der Seren (1:50).

Darüber hinaus wurde die durch Ab1'-vermittelte ADCC-Antwort anhand der Zunahme der Lyse von CA125-positiven und -negativen Zellen durch PBLs von gesunden Probanden (Effektor:Target-Ratio 25:1) nach Zugabe von hitzeinaktivierten Prä- und Postimmunseren (1:20) der Patientinnen überprüft (LDH-Release).

Ergebnisse

Anhand unterschiedlicher Verfahren konnte gezeigt werden, dass in 22 von 26 Ab3-positiven Patientinnen nach Immunisierung mit dem anti-idiotypischen Antikörper ACA125 (Ab2) spezifische anti-anti-idiotypische Antikörper Ab1' induziert werden. Dabei war jedoch eine Diskrepanz zwischen der Reaktivität mit isoliertem CA125-Antigen und CA125 auf Ovarialkarzinomzellen zu beobachten, da 18 Patienten spezifische Antikörper gegen CA125-positive Zellen aufwiesen, während eine Reaktivität mit isoliertem CA125 nur in 6 Fällen nachgewiesen werden konnte. Unterschiedliche Sensitivität der Assayformate sowie Verlust von Epitopen durch den Aufreinigungsprozess sind mögliche Erklärungen für dieses Phänomen. Nach Dissoziation von Ab1'-Antigenkomplexen konnte jedoch in 20 Patientinnen eine Reaktivität mit isoliertem Antigen detektiert werden (Fig. 1).

In 14 der 26 Patientinnen wurde eine ADCC gegen CA125-positive Zellen nach Zugabe von Postimmunserum beobachtet (10,8 bis 50 % Lyse) (Fig.

2). Dabei handelte es sich um Patientinnen mit Ab1', die spezifisch an CA125-positive Zellen binden (Fig. 3A). Im Gegensatz dazu war bei den 12 ADCC-negativen Patienten nur in 4 Fällen eine schwache Bindung an CA125-positive Zellen zu finden (Fig. 3B). Eine direkte Korrelation zwischen
5 Reaktivität von freien Ab1' und Ab1'-Komplexen mit isoliertem CA125-Antigen und ADCC-Antwort bestand nicht, da diese gleichermaßen bei ADCC-negativen und ADCC-positiven Patientinnen nachweisbar waren (Fig. 3 C und D).

10 Schlussfolgerung

Das Anti-Idiotypen-Vakzin ACA125 ist in der Lage, die immunologische Toleranz gegen CA125 zu überwinden, da in 85 % der Ab3-positiven Patientinnen CA125-spezifische Ab3-Antikörper (Ab1') induziert werden. Die Ergebnisse der vorliegenden Studie zeigen, dass Ab1', die an CA125-
15 positive Zellen binden, eine spezifische ADCC-Antwort vermitteln können, die somit ein möglicher cytotoxischer Mechanismus der Anti-Idiotypen-Vakzinierung darstellt. Die Bildung von Immunkomplexen zwischen Ab1' und zirkulierendem CA125 scheint jedoch in manchen Fällen die Induktion einer cytotoxischen Reaktion in Form einer ADCC zu verhindern.

20

Ansprüche

1. Anti-anti-idiotypischer Antikörper,
dadurch gekennzeichnet,
dass er
 - (i) mit einem anti-idiotypischen Antikörper gegen den anti-CA125-Antikörper reagiert,
 - (ii) spezifisch für das Tumor-assoziierte Antigen CA125 ist und mit diesem reagiert, und
 - (iii) eine Antikörper-abhängige zelluläre Cytotoxizität gegen CA125-exprimierende Tumorzellen vermittelt.
2. Anti-anti-idiotypischer Antikörper nach Anspruch 1,
dadurch gekennzeichnet,
dass er mit dem durch das Hybridom 3D5 (DSM ACC2120) produzierten monoklonalen anti-idiotypischen anti-CA125-Antikörper ACA125 reagiert.
3. Anti-anti-idiotypischer Antikörper nach Anspruch 1 oder Anspruch 2,
dadurch gekennzeichnet,
dass er als Folge einer polyklonalen Immunantwort auf einen anti-idiotypischen Antikörper gegen den anti-CA125-Antikörper erzeugt wird.
4. Anti-anti-idiotypischer Antikörper nach Anspruch 1 oder Anspruch 2,
dadurch gekennzeichnet,
dass er rekombinant erzeugt wird.
5. Anti-anti-idiotypischer Antikörper nach Anspruch 1 oder Anspruch 2,
dadurch gekennzeichnet,

dass er als monoklonaler Antikörper durch Hybridomzellen erzeugt wird.

5 6. Hybridomzelllinie, die den monoklonalen anti-anti-idiotypischen Antikörper nach Anspruch 5 produziert.

10 7. Fragment eines anti-anti-idiotypischen Antikörpers nach einem der Ansprüche 1 bis 5,
dadurch gekennzeichnet,
dass es die Bindungsspezifität des anti-anti-idiotypischen Antikörpers besitzt.

15 8. Fragment nach Anspruch 8,
dadurch gekennzeichnet,
dass es ein Fab- oder F(ab)₂-Fragment des anti-anti-idiotypischen Antikörpers umfasst.

20 9. Pharmazeutische Zusammensetzung umfassend einen anti-anti-idiotypischen Antikörper nach einem der Ansprüche 1 bis 5 oder ein Fragment nach Anspruch 7 oder Anspruch 8.

25 10. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 9,
dadurch gekennzeichnet,
dass sie weiter pharmazeutisch übliche Träger- und Hilfsstoffe enthält.

30 11. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 8 oder Anspruch 9 zur Behandlung und/oder Prophylaxe von CA125-exprimierenden Tumoren.

12. Verwendung eines anti-anti-idiotypischen Antikörpers nach einem der Ansprüche 1 bis 5 oder eines Fragments nach Anspruch 7 oder

Anspruch 8 zur Behandlung und/oder Prophylaxe von CA125-exprimierenden Tumoren.

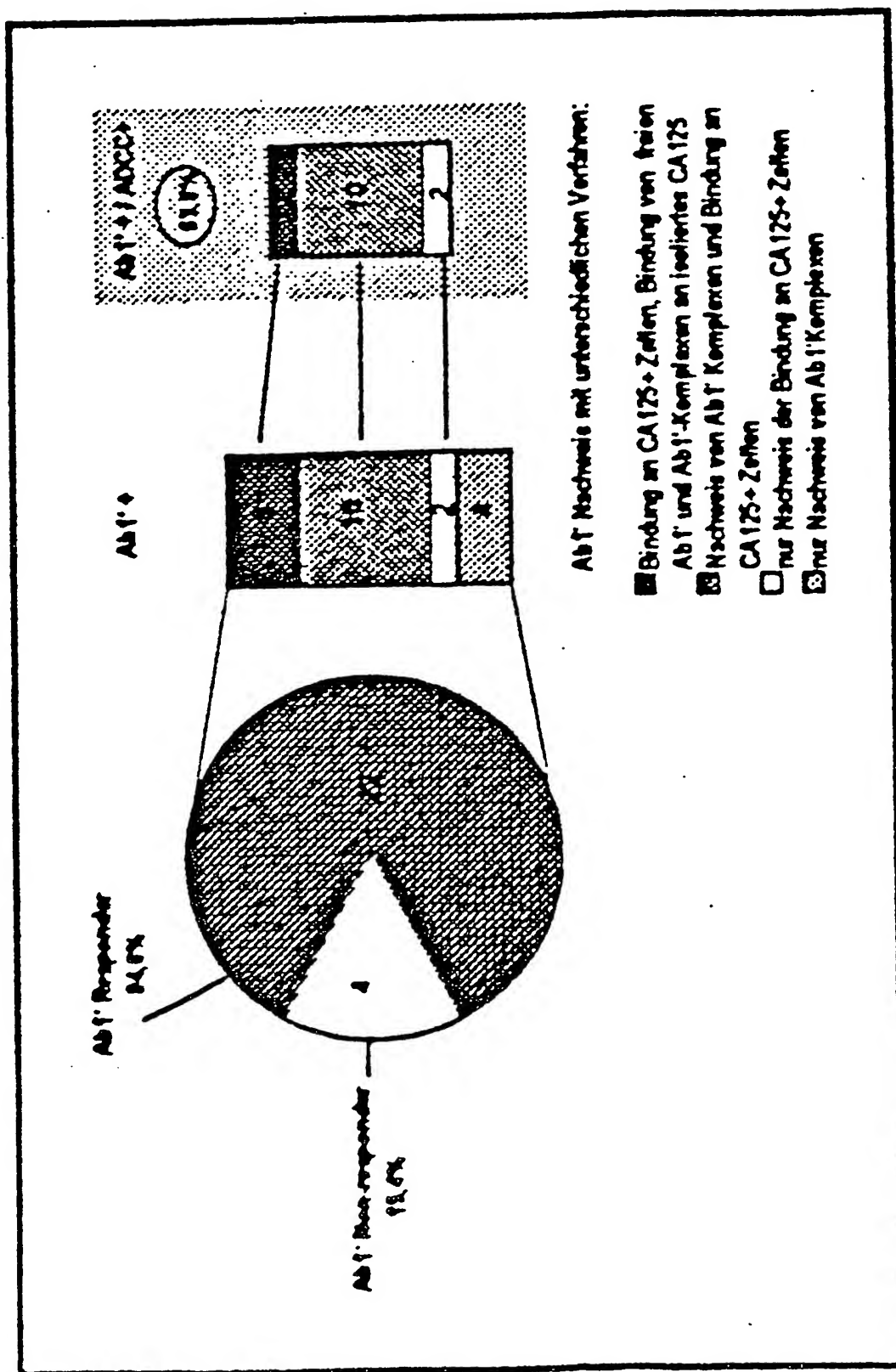
Zusammenfassung

Die vorliegende Erfindung betrifft spezifische anti-anti-idiotypische
5 Antikörper welche mit anti-idiotypischen anti-CA125-Antikörpern reagieren
und für das Tumor-assoziierte Antigen CA125 spezifisch sind.
Insbesondere betrifft die vorliegende Erfindung einen CA125-spezifischen
anti-anti-idiotypischen Antikörper, der mit dem anti-idiotypischen anti-
CA125-Antikörper ACA125 reagiert. Des Weiteren betrifft die vorliegende
10 Erfindung diese anti-anti-idiotypischen Antikörper enthaltende
pharmazeutische Zusammensetzungen zur Behandlung von CA125-
exprimierenden Tumoren, insbesondere von Ovarialkarzinomen.

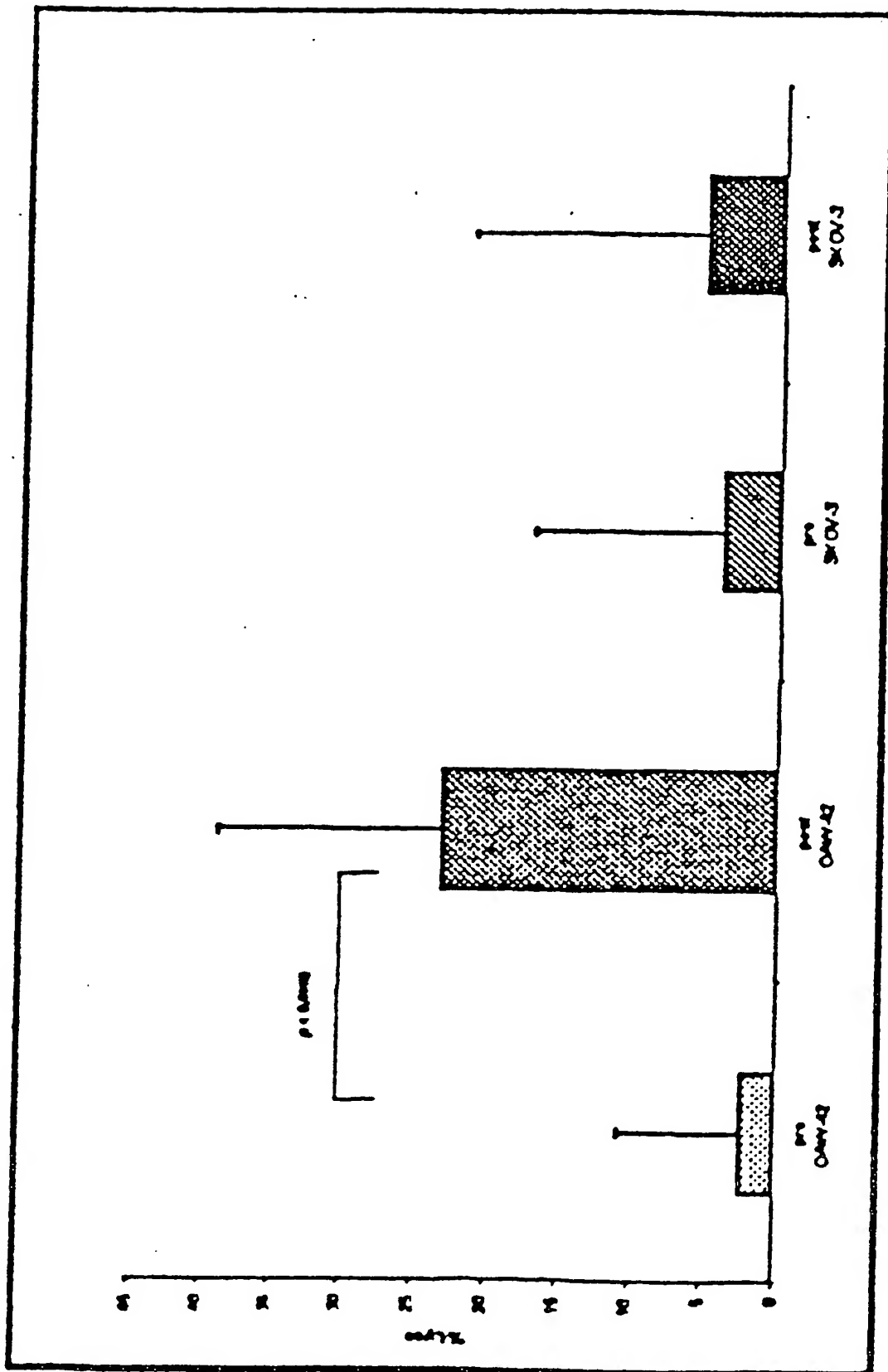
15

wr/ANM/27680PDE/08.03.2002

Figur 1



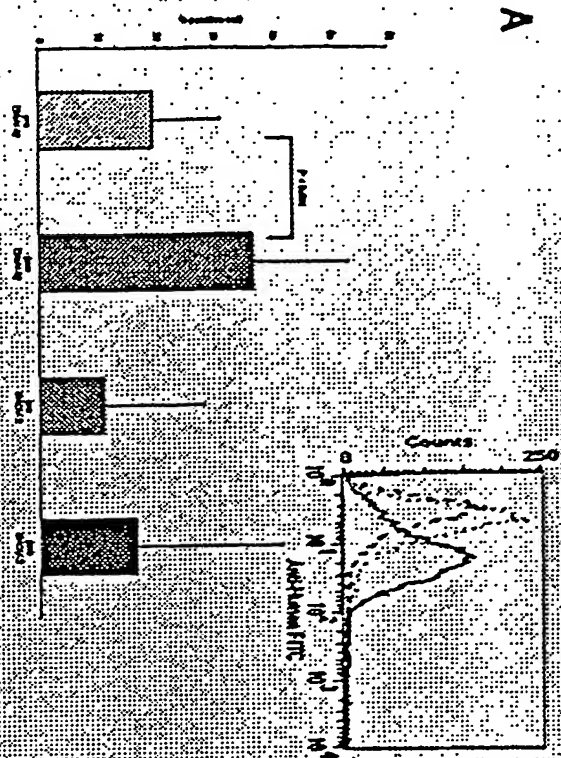
Figur 2



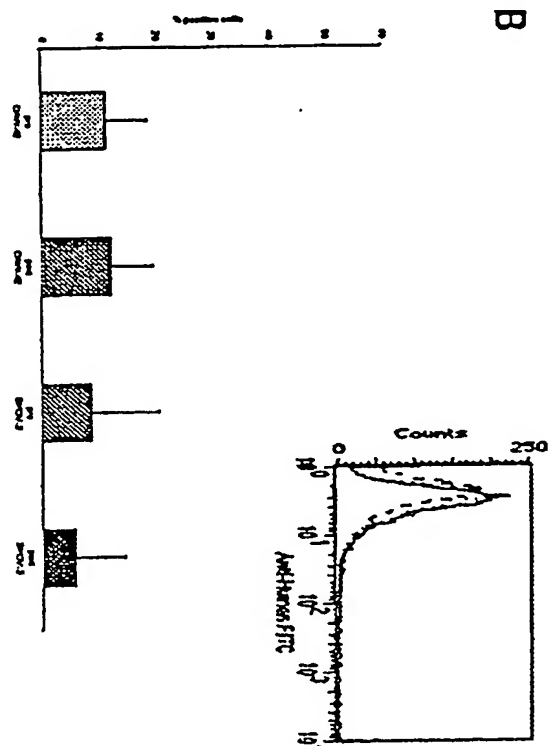
Figur 3

ADCC-positive Patienten (n=14)

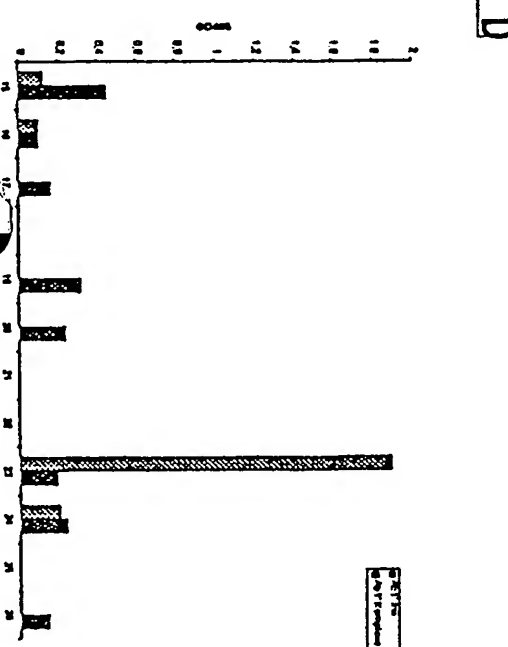
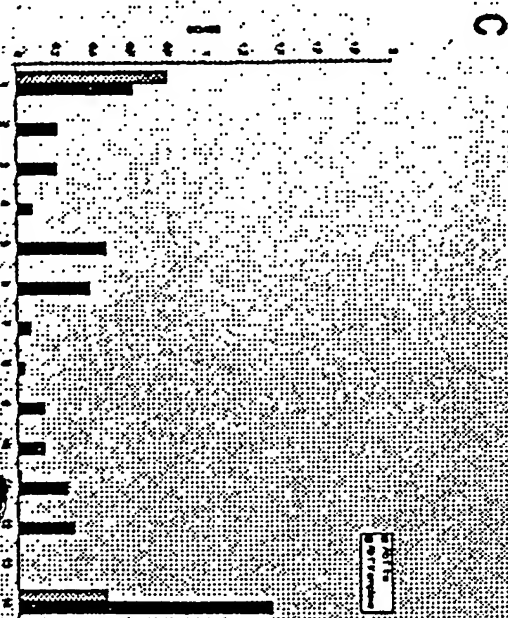
Bindung von Ab1 an OAW-42 (CA125+)



ADCC-negative Patienten (n=12)



Bindung von Ab1 (frei/Komplexe) an isoliertes CA125-Antigen



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.